

References

1. ATKINS, E., *Physiol. Rev.* 40, 580 (1960). — 2. DESPERAK-NACIAZEK, A. and J. VENULET, *Acta physiol. polon.* 11, 623 (1960). — 3. VENULET, J. and A. DESPERAK-NACIAZEK, *J. Pharmacy Pharmacol.* 12, 656 (1960). — 4. VENULET, J. and A. DESPERAK-NACIAZEK, *Experientia (Basel)* 13, 365 (1957). — 5. VENULET, J. and A. DESPERAK-NACIAZEK, *Arch. int. Pharmacodynam. Thérap.* 144, 465 (1963). — 6. SLATER, E. C. and W. D. BONNER, *Biochem. J.* 52, 185 (1952). — 7. DESPERAK-NACIAZEK, A. and J. VENULET, Unpublished results. — 8. SCHLÜTZ, G. O., J. VENULET and E. E. BITTAR, Sixth Int. Congress of Biochemistry, New York, August 1964. (Abstracts V/145.) — 9. PALMER, I. W. and D. T. GERLOUGH, *Science (New York)* 92, 155 (1940). — 10. WESTPHAL, O., O. LUDERITZ, E. EICHENBERGER and W. KEIDERLING, *Z. Naturforsch.* 7b, 536 (1952).

Professor Dr. med. G. O. Schlütz
Center of Research,
University of Damascus
Damascus, Syria

Permanent address
Med.-Chem. Laboratorium Dr. Schlütz
78 Freiburg i. Br.

Fermente des menschlichen Blutes¹⁾

XI. Mitteilung: Mikromethode zur Bestimmung der Enzymaktivität des Serums und der Erythrozyten für sieben verschiedene Substrate

Von W. PILZ

Aus dem physiologisch-chemischen und analytischen Labor (Dr. W. Pilz) der Ärztlichen Abteilung (Dr. H. Hörlein) der Farbenfabriken Bayer AG., Werk Leverkusen

(Der Schriftleitung zugegangen am 22. September 1964)

Es wird eine zusammengefaßte Darstellung der Bestimmung der Serumesterasen (Substrate: Acetylcholin, Benzoylcholin, α -Naphthylpropionat, β -Naphthylpropionat, Phenylacetat, Monosuccinylcholin, Disuccinylcholin) und der Erythrozytencholinesterase gegeben. Für alle Substrate ist die Beziehung zwischen eingesetzter Serummenge und gespaltenen Estermenge an jeweils 4 verschiedenen Sera untersucht worden. Substratkonzentration und Menge des eingesetzten biologischen Materials sind so geregelt, daß man sich stets im linearen Teil dieser Beziehung bewegt. Für alle Serumesterasebestimmungen sind nur 3,0 ml Serum notwendig. Da in allen Fällen die Substratkonzentration konstant ist und die Resultate einheitlich in U/ml/Std. angegeben werden, können die Werte untereinander verglichen werden. Als Beleganalysen wurden das Mittel aus 250 Normalpersonen sowie die Esteraseaktivitäten eines Falles von verlängerter Apnoe nach Succinylcholin und eines Falles von Myotonie angegeben.

The determination of serum esterases (substrates: acetylcholine, benzoylcholine, α -naphthylpropionate, β -naphthylpropionate, phenylacetate, monosuccinylcholine, disuccinylcholine) and erythrocyte cholinesterases is reviewed. The relationship between the amount of serum used and the amount of ester hydrolysed with 4 different sera was investigated for every substrate. The substrate concentration and the amount of added biological material are standardized in order to obtain the linear part of this relationship. Only 3.0 ml of serum are necessary for each serum esterase determination. Since the substrate concentration is constant in all cases and the results are given uniformly as units/ml/hr, the values can be compared. As test analyses, the average esterase activities of 250 normal persons, a case of prolonged apnoea after succinylcholine, and a case of myotonia are given.

In letzter Zeit häufen sich die Fälle, in denen nach Applikation von Disuccinylcholin eine stark verlängerte Apnoe auftritt. Die Verlängerung der Apnoe, wobei es zu lebensbedrohlichen Zuständen kommt, wird nach der neuesten Version von BAITSCH (2) auf ein mangelndes Spaltvermögen des menschlichen Serums für die Droge als Folge der Verminderung von atypischen Pseudocholinesterasen zurückgeführt. Daß diese Version problematisch ist, konnten wir vor kurzem beweisen (1). Da jedoch in der Mehrzahl der Fälle von verlängerter Apnoe, die bisher untersucht wurden, atypische Pseudocholinesterasen gefunden wurden, sollte man von der Möglichkeit der enzymatischen Analyse bei allen Patienten, bei denen eine Anästhesie mit Succinylcholin vor-

gesehen ist, Gebrauch machen und bei allen jenen, die abnorme Fermentwerte haben, von der Applikation des Relaxans Abstand nehmen, um Narkosezwischenfälle zu vermeiden. — Es muß betont werden, daß ein ursächlicher Zusammenhang zwischen verlängerter Apnoe nach Succinylcholin und dem gleichzeitigen Vorhandensein atypischer Esterasen bisher *nicht* bewiesen werden konnte, sondern daß es sich dabei lediglich um eine Erfahrungstatsache handelt. Es ist zum Beispiel nicht bekannt, wieviele Fälle von verlängerter Apnoe auftraten, die *normale* Esterasen hatten; andererseits liegen Untersuchungen über die Häufigkeit von Trägern atypischer Esterasen vor, von denen nicht bekannt ist, wie sie auf Succinylcholin reagieren (3, 4).

Am häufigsten wurde zur Feststellung atypischer Esterasen die sogenannte Dibucainnummer (5) oder die

¹⁾ X. Mitteilung: siehe Literatur (1).

Fluoridnummer (6) ermittelt. Dieses Verfahren hat eine Reihe von Nachteilen, vor allem den, daß als Substrat Benzoylcholin verwendet wird, dessen analytische Bestimmung bisher immer im UV-Bereich vorgenommen wurde (Notwendigkeit kostspieliger Spektralphotometer). An anderer Stelle (7) sind zur Bestimmung der Kennzahlen elektronische Titrationsgeräte nötig, die ebenfalls sehr aufwendig sind; die klassische Methode der Titration von Hand erweist sich als viel zu ungenau. Auch der Diffusionstest von GOEDDE (8) erscheint uns wenig geeignet (Verwendung von nur einem Substrat, das zudem unspezifisch ist; vgl. 1, 17). Die verwendete Diazoniumlösung gibt unter den beschriebenen Bedingungen keine lineare Beziehung zwischen Konzentration bzw. Fermentaktivität und Extinktion, worüber wir noch ausführlich berichten werden.

Nach unseren bisherigen Untersuchungen (1) ist die Enzymaktivität des Serums gegen eine Reihe von Substraten verändert. Außerdem ist die Acetylcholinesterase der Erythrozyten — zumindest in dem von uns referierten Fall — deutlich vermindert. Aus Hemmversuchen geht hervor, daß außerdem auch das Arylesterasesystem (9, 10) verändert ist (1). Es ist deshalb notwendig, eine quantitative enzymatische Analyse des Serums gegen folgende Substrate durchzuführen: Acetylcholin, Benzoylcholin, Phenylacetat, β -Naphthylpropionat, α -Naphthylpropionat, Monosuccinylcholin und Disuccinylcholin. Gleichzeitig sollte eine Bestimmung der Aktivität der Acetylcholinesterase der Erythrozyten erfolgen. Wie zu zeigen sein wird, sind alle diese Bestimmungen mit 3,0 ml Serum durchführbar; für die Bestimmung der Erythrozytencholinesterase ist ein Erythrozytenvolumen von 0,5 ml notwendig.

Die Methode wurde so ausgearbeitet, daß die Werte miteinander in Beziehung zu setzen sind. Das ist besonders wichtig, wenn man das Fermentsystem des Serums in normale und abnormale Typen einteilen will, was in jüngster Zeit von RUBINSTEIN und DIETZ (11) gezeigt wurde. Danach kann allein durch eine Bestimmung der Esteraseaktivitäten gegen Benzoylcholin und Acetylcholin eine Zuordnung des Patienten in drei verschiedene Typen erfolgen, von dem nur ein Typ, dem allerdings mindestens 98% der Bevölkerung angehören, nach den bisher bekannt gewordenen Erfahrungen eine Relaxation mit Succinylcholin ohne weiteres verträgt. Wir halten es trotzdem für erforderlich, auch die anderen hier beschriebenen Substrate mit in die Analyse einzu beziehen, da wir im Besitz von Hinweisen sind, daß auch diese Fermente bei Vorliegen ungewöhnlicher Enzymverhältnisse verändert sind. Wir hoffen, daß mit Hilfe dieser Methode eine breitere Streuung und eine Häufung von diesbezüglichen Resultaten möglich ist.

Methode

Prinzip

Wasserlösliche Ester

Je Substrat werden ein „V“ (= Vergleichs)- und zwei „M“ (= Meß)-Werte angesetzt, die beide Substrat enthalten, jedoch nur der Meßwert biologisches Material.

Nach Beendigung der Bebrütung wird nach (12) der nicht enzymatisch gespaltene Ester durch Umsetzung mit alkalischem Hydroxylamin und photometrische Messung der Eisen-(III)-hydroxamate (13, 14) bestimmt. Die Differenz zwischen dem V- und dem Mittel der beiden M-Werte ist ein Maß für die Enzymaktivität. Enzymaktivitäten werden bei allen Substraten nach internationaler Gepflogenheit (15) in U/ml Serum/Std. angegeben, ein Wert, der es erlaubt, die Aktivitäten ein und desselben Serums gegen verschiedene Substrate miteinander in Beziehung zu setzen.

Nicht-wasserlösliche Ester

Darunter fallen α -Naphthylpropionat und β -Naphthylpropionat. β -Naphthylpropionat spaltende Fermente werden durch die Bestimmung des enzymatisch in Freiheit gesetzten β -Naphthols durch Kupplung mit einer Diazoniumlösung und photometrische Messung des dabei entstehenden Farbstoffes bestimmt (9, 10). Enzymaktivitäten gegen α -Naphthylpropionat werden analog bestimmt, nur ist es dazu notwendig ein anderes Diazoniumsalz zu verwenden. Das Spektrum des Farbstoffes in n-Pentanol ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

Substrate

Die Auswahl der Substrate richtet sich nach den zu bestimmenden Fermenten.

1. Spezifische Serumacetylcholinesterase (vgl. 1); *Substrat*: Acetylcholin.
2. Serumaliesterase (auch „Pseudocholinesterase“, „Serumcholinesterase“, „Tributyrylase“ genannt); *Substrate*: Benzoylcholin, α -Naphthylpropionat (*nicht* das Butyrat, vgl. 1, 17). Es ist notwendig, die Aktivität des Serums gegen beide Substrate zu prüfen, da es vorkommt, daß nur die Aktivität gegen eines der beiden Substrate vermindert ist.
3. Arylesterasen (9, 10); *Substrate*: β -Naphthylpropionat und Phenylacetat. Es handelt sich mit Sicherheit um mindestens zwei verschiedene Esterasen (vgl. 10), wahrscheinlich sogar um mehr als zwei (16).
4. Succinylcholinesterasen; *Substrate*: Monosuccinylcholin und Disuccinylcholin. Es handelt sich um zwei verschiedene Esterasen, die sich elektrophoretisch voneinander trennen lassen und als getrennte, isolierte Proteine sehr aktiv sind, während deren Aktivitäten im Vollserum in allen von uns bisher untersuchten normalen und pathologischen Fällen kleiner als 1 U/ml Serum/Std. sind (vgl. 1). — Die Aktivität gegen Tributyrin braucht nicht bestimmt zu werden, da sie sich in allen Fällen analog der Aktivität des Serums gegen Benzoylcholin verhält.
5. Acetylcholinesterase der Erythrozyten; *Substrat*: Acetylcholin. Auch dieses Ferment kann bei Patienten mit verlängerter Apnoe vermindert sein.

Substratkonzentration, Reaktionskinetik

Wie schon früher (12) von uns gezeigt wurde, liegt das Substratoptimum für die Aliesterase (hier verwendete Substrate: Benzoylcholin und α -Naphthylpropionat) bei

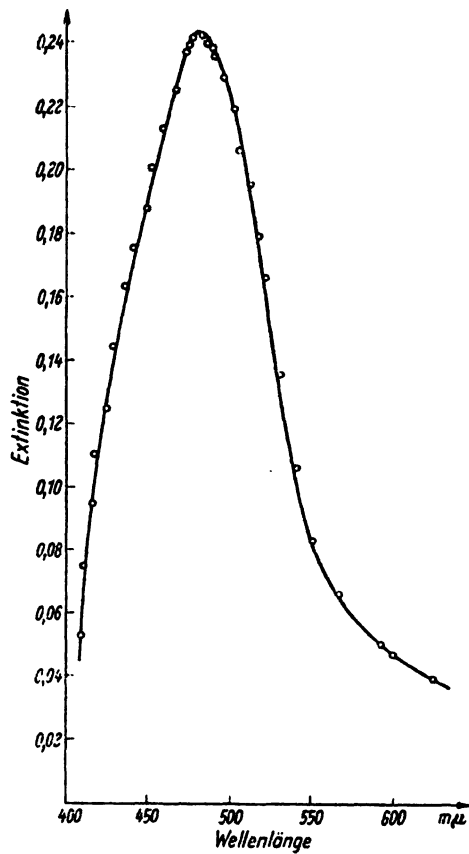


Abb. 1

Spektrum des zur Messung von α -Naphthol verwendeten Farbstoffes in *n*-Pentanol

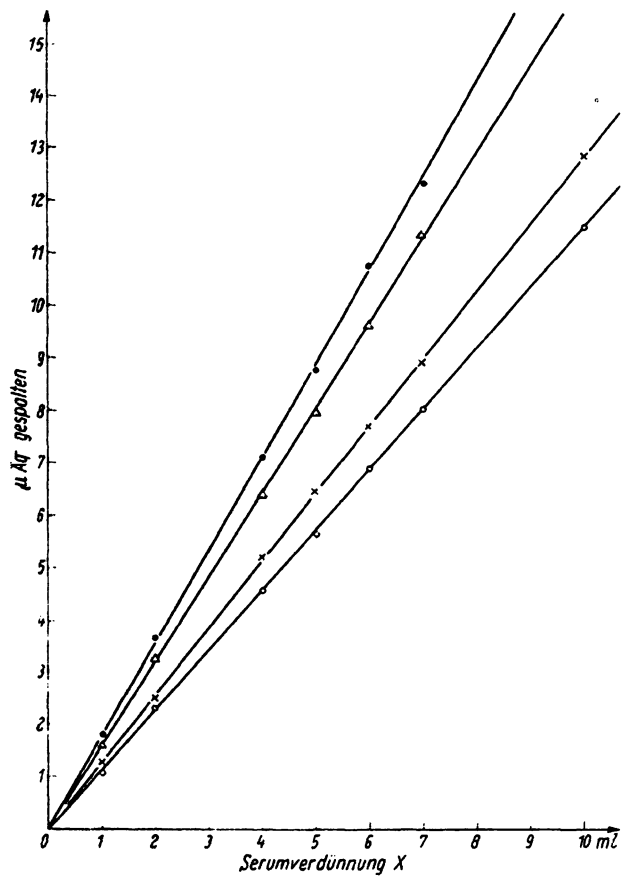


Abb. 3

Beziehung zwischen der Menge eingesetzten Serums und der erreichten Spaltung. (Serumverdünnung X; Substrat: Benzoylcholin)

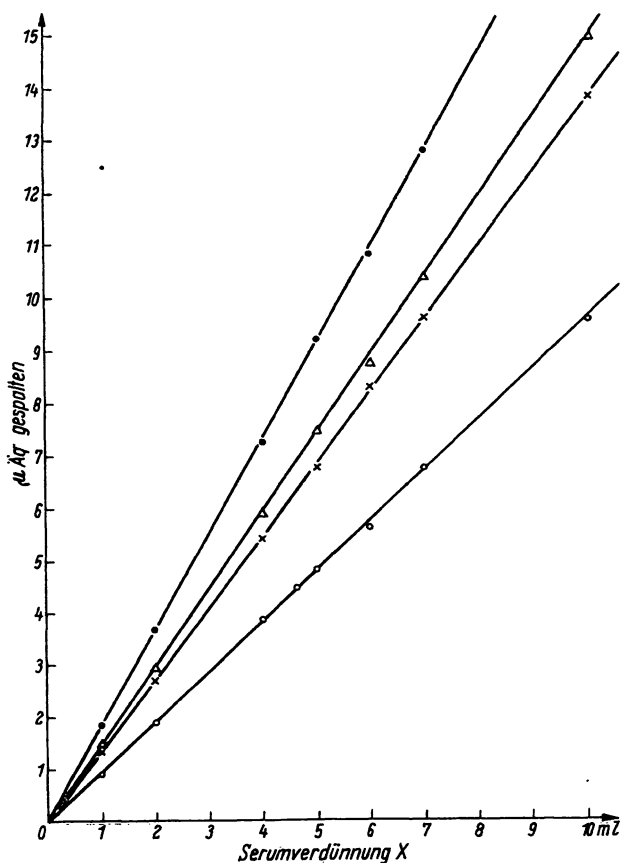


Abb. 2

Beziehung zwischen der Menge eingesetzten Serums und der erreichten Spaltung. (Serumverdünnung X; Substrat: Acetylcholin)

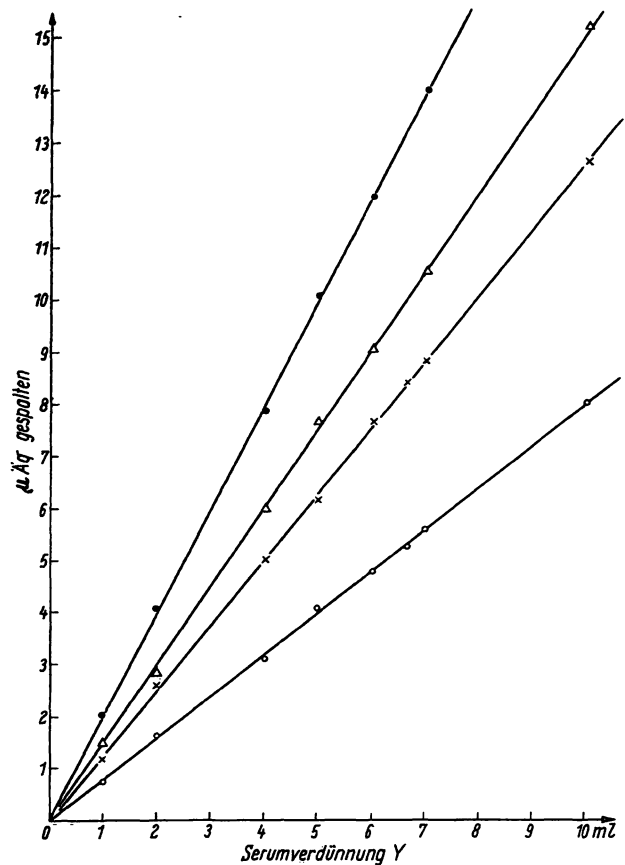


Abb. 4

Beziehung zwischen der Menge eingesetzten Serums und der erreichten Spaltung. (Serumverdünnung Y; Substrat: α -Naphthylpropionat)

so hohen Substratkonzentrationen, daß eine photometrische Bestimmung im Optimum nicht mehr möglich ist. Es ist daher notwendig, einen Meßbereich aufzusuchen, in dem Linearität zwischen der Menge des eingesetzten biologischen Materials und der Spaltung besteht, wobei Ausgangssubstratkonzentration, Bebrütungszeit und -temperatur konstant gehalten werden. Da dies für die Aliesterase notwendig war, mußten für alle anderen zu bestimmenden Fermente analoge Bedingungen eingehalten werden, was dadurch erreicht wurde, daß die Konzentration der einzusetzenden Serumverdünnung entsprechend variiert wurde.

Zur Prüfung dieser Verhältnisse wurde bei jedem Substrat die Menge der dazu vorgesehenen Serumverdünnung variiert und zur Anzahl der gespaltenen $\mu\text{Äq}$ in Beziehung gesetzt. Dabei wurden jeweils 4 verschiedene Sera untersucht. Es ergibt sich demnach für jedes Substrat je nach Aktivität des Serums eine Schar von 4 Kurven. Die Konzentration der Serumverdünnung muß so gewählt werden, daß bei Einsatz von 5 ml derselben die Beziehung zur Aktivität im linearen Bereich der Kurve liegt. Das ist der Fall für Acetylcholin (Abb. 2), Benzoylcholin (Abb. 3), α -Naphthylpropionat (Abb. 4), Phenylacetat (Abb. 5), β -Naphthylpropionat (Abb. 6) und die Erythrozytenacetylcholinesterase (Abb. 7).

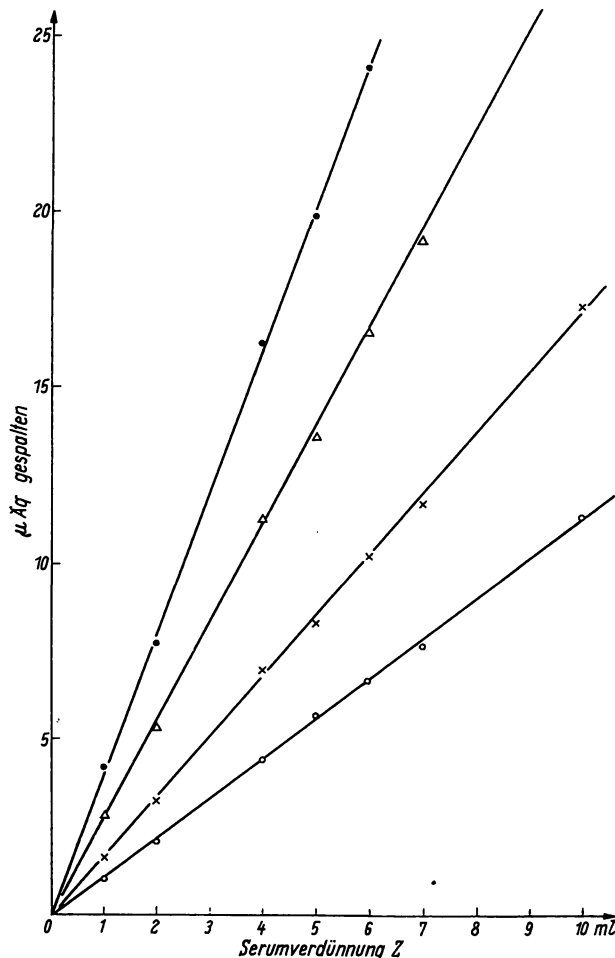


Abb. 5

Beziehung zwischen der Menge eingesetzten Serums und der erreichten Spaltung. (Serumverdünnung Z; Substrat: Phenylacetat)

Aus den Abbildungen geht hervor, daß durch Aktivitätsunterschiede zwischen einzelnen Sera — auch wenn diese Unterschiede relativ groß sein sollten — keine Störung der Methode eintritt. Man befindet sich in allen Fällen noch im linearen Bereich der Beziehung zwischen eingesetzter Serummenge und Aktivität. Die Substratkonzentration beträgt in allen Fällen (mit Ausnahme der beiden Bernsteinsäureester) $1,11 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$ bei einem Ansatzvolumen von insgesamt 30 ml.

Unter den gewählten Bedingungen war es uns stets unmöglich, eine meßbare Aktivität des Vollserums gegen die beiden Succinylcholinester zu finden. Wir griffen daher auf die Angabe von KALOW (7) zurück, der mit Hilfe von elektronisch gesteuerter Titration das Substratoptimum für Succinylcholin bestimmte. Zum Verständnis geben wir die von KALOW ermittelte Kurve in Abbildung 8 wieder; wir haben lediglich die Einheiten für die Aktivität in internationale Einheiten ($\mu\text{Äq/Std./ml Serum}$) umgerechnet. Um mit Sicherheit eine Succinylcholinesterase, falls eine solche jemals im Vollserum auftreten sollte, erfassen zu können, verlegten wir unsere Substratkonzentration in das Optimum der von KALOW beschriebenen Beziehung ($2,66 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$, vgl. — Linie in Abb. 8). Danach müssen von 1 ml Serum bei der von uns gewählten Substratkonzentration je Stunde 478 $\mu\text{Äq}$ Disuccinylcholin gespalten werden,

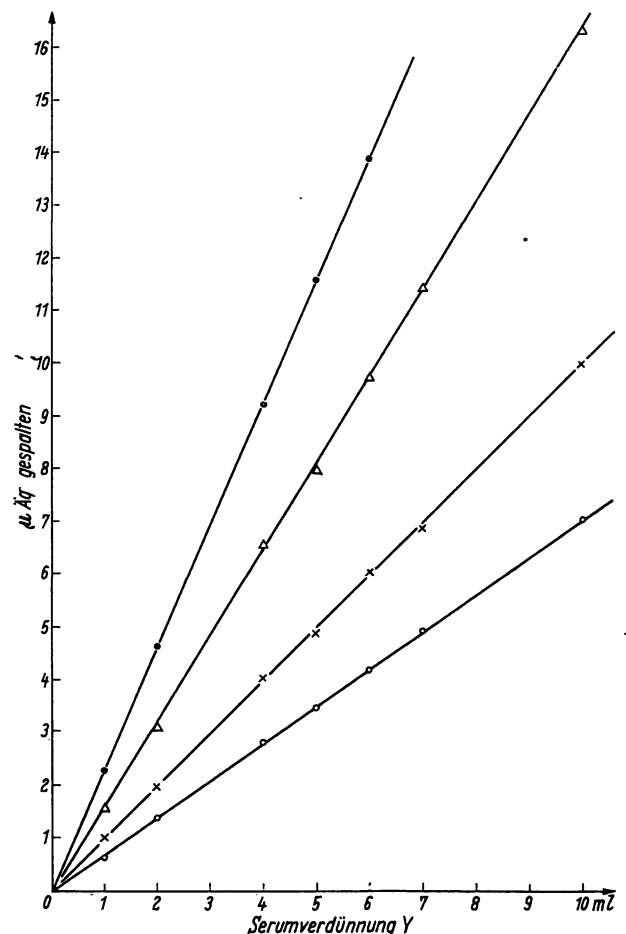


Abb. 6

Beziehung zwischen der Menge eingesetzten Serums und der erreichten Spaltung. (Serumverdünnung Y; Substrat: β -Naphthylpropionat)

das sind etwa 9% des vorgelegten Substrates. Da wir auch hierbei niemals eine Spaltung feststellen konnten, verlängerten wir die Bebrütungszeit unter Beibehaltung der anderen Bedingungen (Substratkonzentration $2,66 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, Einsatz von 1,0 ml unverdünntem

Serum, Bebrütungstemperatur 37°) auf 24 Stunden. In keinem Fall haben wir eine Spaltung gefunden, die größer war als 1 U/ml/Std. Trotzdem beziehen wir die beiden Substrate Monosuccinylcholin und Disuccinylcholin in die Methode mit ein, da es nicht auszuschließen ist, daß dadurch der eine oder andere Ausnahmefall mit meßbarer Succinylcholinaktivität im Vollserum entdeckt wird, was insbesondere im Zusammenhang mit den in (1) wiedergegebenen Resultaten von großer Bedeutung für die weitere Erforschung des gesamten Problemkomplexes sein kann.

Ausführung

Reagenzien

Essigsäure 1-n: 56,8 ml Eisessig (Merck; $d = 1,055-1,058$) werden in einem 1000-ml-Meßkolben zur Marke aufgefüllt. Kontrolle durch Titration mit 1-n NaOH gegen Phenolphthalein.

Puffer pH = 4,62: 200 ml 1-n Essigsäure + 100 ml 1-n NaOH werden in einem 1000-ml-Meßkolben zur Marke aufgefüllt. Kontrolle durch elektrometrische pH-Messung.

Puffer pH = 1,4: 10,5 g Citronensäure (Monohydrat, Merck) + 4,0 g NaOH werden in wenig Wasser in einem 500-ml-Meßkolben gelöst, 445 ml 1-n Salzsäure zugesetzt und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Prüfung: 10 ml werden auf 100 ml aufgefüllt; in dieser Lösung wird der pH-Wert elektrometrisch kontrolliert.

Boratpuffer: 31,0 g Borsäure ($B(OH)_3$, Merck) werden in einem 1000-ml-Meßkolben in ca. 700 ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 20 ml 1-n NaOH zur Marke aufgefüllt.

Natronlauge 2,5-n: 100 g NaOH werden mit Wasser zu 1000 ml gelöst.

Hydroxylamin 1-n: 70 g Hydroxylamin-Hydrochlorid werden mit Wasser zu 1000 ml gelöst; die Lösung ist nicht länger als 6 Wochen (Dunkelheit) haltbar.

Alkalisches Hydroxylamin: Gleiche Volumenteile 2,5-n NaOH und 1-n $NH_2OH \cdot HCl$ werden gemischt; diese Lösung ist nur ca. 1 Std. haltbar und muß zu jeder Analyse neu angesetzt werden.

Eisenlösung: 337,5 g Eisen-(III)-ammoniumalaun (Merck) werden unter Zusatz von 25 g Kaliumnitrat (Merck) unter leichtem Erwärmen am Wasserbad zu 1000 ml gelöst.

Trichloressigsäure 0,5-n: 81,7 g Trichloressigsäure (p. a. Merck) werden zu 1000 ml mit Wasser gelöst.

DZ-Lösung I: 0,3 ml frisch dest. 4-Aminophenetol (Kp. $111^\circ/5\text{mm}$) werden in einem 100-ml-Meßkolben in 5 ml 1-n Salzsäure gelöst, etwas Eis (aus dest. Wasser bereitet!) zugesetzt und mit 5 ml 10-proz. Na-Nitritlösung diazotiert. Nach 5 Minuten setzt man 20 ml einer 10-proz. Sulfaminsäurelösung zu, schwenkt stark um, um den Stickstoff soweit als möglich zu vertreiben, und füllt mit Wasser zur Marke auf. Die Lösung ist farblos bis schwach gelblich gefärbt und bei Zimmertemperatur einen Tag haltbar. Sobald sie sich nach braun verfärbt, ist sie zu verwerfen.

DZ-Lösung II: Diazotiertes 4-Amino-4'-methoxy-diphenylamin = „Variaminblau-Salz“ = „Fast Blue VB salt“ (Fa. Serva, Heidelberg); in einem 100 ml fassenden Meßkolben werden 500 mg der Substanz mit 10 ml 1-n HCl übergossen und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Nach einigem Schütteln tritt Lösung ein. Die Lösung ist 6 bis 8 Stunden haltbar.

Bicarbonat 0,5-n: 42,01 g werden zu 1000 ml gelöst.
n-Pentanol.

Standardpuffer; 200 ml Boratpuffer (s. o.) + 20 ml Puffer pH = 4,62 werden mit Wasser zu 1000 ml verdünnt; die elektrometrische pH-Messung muß pH = 7,2–7,3 ergeben.

Substratstammlösungen

10 mMol des als Substrat vorgesehenen Esters werden in einen Meßkolben eingewogen und zu 50 ml gelöst; 1,81 g Acetylcholinhydrochlorid (Merck), 2,61 g Benzoylcholinhydrochlorid (Schu-

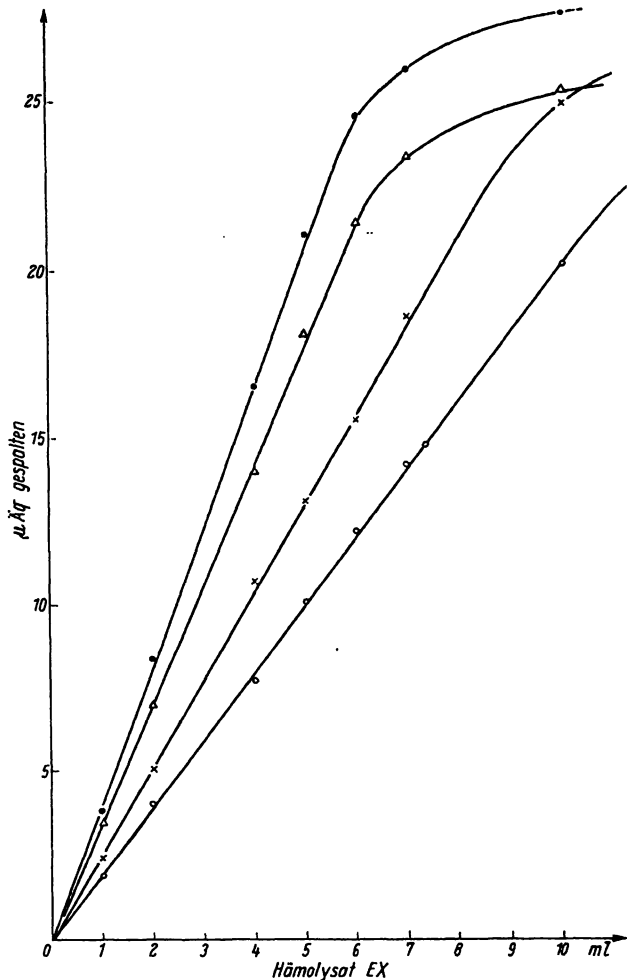


Abb. 7

Beziehung zwischen der Menge eingesetzten Hämolsates und der erreichten Spaltung. (Hämolsat EX; Substrat: Acetylcholin)

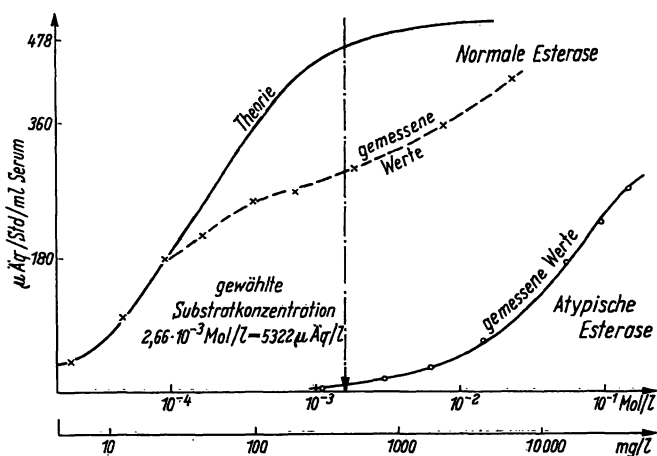


Abb. 8

Beziehung zwischen Aktivität und Substratkonzentration nach KALOW.

Obere Abszisse: Konzentration von Disuccinylcholin in Mol/l;
untere Abszisse: Konzentration von Disuccinylcholin in mg/l.

chardt), 2,58 g Monosuccinylcholin (Schuchardt), 4,02 g Disuccinylcholin (Succinyl-Asta siccum) werden jeweils mit Wasser, 2,01 g α -Naphthylpropionat, 2,01 g β -Naphthylpropionat, 1,36 g Phenylacetat werden jeweils mit reinem Alkohol zu 50 ml gelöst.

Bereitung der Substrate

Jeweils 1 ml α - oder β -NaphthylpropionatstammLösung werden im Mixer, der 150 ml Standardpuffer + 1 ml 4-proz. wäßrige Lösung von Gummi arabicum enthält, bei höchster Drehzahl langsam eingetropft. Das Substrat ist für die Dauer der Untersuchung stabil. Alle anderen Substrate werden wie folgt bereitet: Zu 150 ml Standardpuffer pipettiert man 1 ml SubstratstammLösung und schüttelt gut um (Ausnahme Monosuccinyl- und Disuccinylcholin: 2 ml StammLösung auf 150 ml Puffer).

Serumverdünnungen

1 ml Serum wird mit physiol. NaCl-Lösung auf 100 ml verdünnt (5 ml = 0,05 ml Serum); (Serumverdünnung X).

50 ml Serumverdünnung X werden wie oben auf 100 ml verdünnt (5 ml = 0,025 ml Serum); (Serumverdünnung Y).

25 ml Serumverdünnung Y werden wie oben auf 100 ml verdünnt (5 ml = 0,00625 ml Serum); (Serumverdünnung Z).

Erythrozytenhämolyse: Geronnenes Blut (4 Std. bei +4°) wird vom überstehenden Serum abgesaugt, die Erythrozyten im Zentrifugenröhrchen 5mal mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen (jedesmal kräftiges Durchschütteln, zentrifugieren und Verwerfen der Waschlösung); vor der letzten Wasche wird das Fibrinogen entfernt (Pinzette). Die möglichst weitgehend von der Waschlösung abgesaugten Erythrozyten werden möglichst genau mit demselben Volumen aqua bidest. hämolytisiert, gut geschüttelt und über Nacht eingefroren. Nach dem Auftauen wird zentrifugiert und 1 ml mit Wasser auf 100 ml verdünnt (5 ml = 0,025 ml Erythrozyten); (Erythrozytenverdünnung EX).

Alle Bestimmungen werden in 100 ml Meßkolben vorgenommen. Eine schematische Darstellung der Arbeitsweise ist in den Tabellen 1 und 2 wiedergegeben. Die nach Tabelle 1 bearbeiteten Ansätze werden mit Wasser zu 100 ml aufgefüllt, gut durchgeschüttelt und 20 Min. stehen gelassen. Sodann wird in ein trockenes Erlenmeyerkölbchen filtriert (doppeltes Faltenfilter Schleicher und Schüll Nr. 602 h), wobei die ersten Filtrat-Anteile verworfen werden. Es kann sofort bei 490 m μ und 1 cm Schichtdicke gegen den Leerwert photometriert werden.

Die nach Tabelle 2 bearbeiteten Ansätze werden kräftig durchgeschüttelt, nach dem Absetzen die obenliegende, den Farbstoff enthaltende organische Phase in ein Zentrifugenröhrchen abgegossen und 10 Min. zentrifugiert. Die zentrifugierte Lösung wird im Verhältnis 1:10 (1 ml Pipette und 10 ml Meßkolben) mit Pentanol verdünnt und gegen die ebenso behandelten Leerwerte bei 5 mm Schichtdicke photometriert und zwar beim Substrat α -Naphthylpropionat bei 480 m μ und beim Substrat β -Naphthylpropionat bei 465 m μ .

Bei den in wäßriger Lösung aufgearbeiteten Ansätzen wird nun das Mittel der Extinktionen aus beiden M-Werten gebildet und von der Extinktion des V-Wertes abgezogen. Es ergibt sich der Wert R (Extinktionseinheiten). — Von den in pentanolischer Lösung aufgearbeiteten Ansätzen wird die Extinktion des V-Wertes

Tab. 1

Ansätze zur Bestimmung von Fermentaktivitäten für die *wasserlöslichen* Substrate (Werte in ml)

Reagens	V	2 x M	V	2 x M	V	2 x M	V	2 x M	V	2 x M	V	2 x M	Leerwert
Substrat Acetylcholin	25	25	25	25	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Substrat Benzoylcholin	—	—	—	—	25	25	—	—	—	—	—	—	—
Substrat Phenylacetat	—	—	—	—	—	—	25	25	—	—	—	—	—
Substrat Monosuccinylcholin	—	—	—	—	—	—	—	—	25	25	—	—	—
Substrat Disuccinylcholin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25	25	—
Physiologische NaCl-Lösung	5	—	5	—	5	—	5	—	5	—	5	—	—
Serumverdünnung X	—	5	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—	—
Serumverdünnung Z	—	—	—	—	—	—	—	5	—	—	—	—	—
Unverdünntes Serum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—
Erythrozytenverdünnung EX	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bebrütung bei 37° (Stdn.)	2	2	2	2	2	2	2	2	24	24	24	24	—
Trichloressigsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	5	5	—
Alkalisches Hydroxylamin	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Puffer pH = 1,4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Eisenlösung	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Tab. 2

Ansätze zur Bestimmung von Fermentaktivitäten für die *wasserunlöslichen* Substrate (Werte in ml)

Reagens	V	2 x M	V	2 x M	Leerwert α	Leerwert β
Substrat α -Naphthylpropionat	25	25	—	—	—	—
Substrat β -Naphthylpropionat	—	—	25	25	—	—
Physiologische NaCl-Lösung	5	—	5	—	—	—
Serumverdünnung Y	—	5	—	5	—	—
Bebrütung bei 37° (Stdn.)	2	2	2	2	—	—
Trichloressigsäure	5	5	5	5	5	5
DZ I-Lösung	—	—	5	5	—	5
DZ II-Lösung	5	5	—	—	5	—
Bicarbonatlösung	10	10	10	10	10	10
Stehen bei Zimmertemperatur (Min.)	20	20	20	20	20	20
n-Pentanol	25	25	25	25	25	25

von dem Mittel der beiden M-Werte abgezogen; man erhält wiederum den Wert R (Extinktionseinheiten).

Berechnung

Die Berechnung der Resultate, die direkt aus den Extinktionen erfolgen kann, beruht auf folgenden Grundlagen:

1. Die Anzahl der $\mu\text{Äq}$ in den wäßrigen Meßlösungen läßt sich direkt aus der Extinktion nach der Gleichung $\text{Ext.} \frac{490 \text{ m}\mu}{10 \text{ mm}} \cdot 1,04 = \mu\text{Äq/ml}$ berechnen (13, 14). Da ein Endvolumen von 100 ml eingehalten wurde, verändert sich die Gleichung wie folgt: $\text{Ext.} \frac{490 \text{ m}\mu}{10 \text{ mm}} \cdot 104 = \mu\text{Äq}$ insgesamt.

2. Da alle Werte in internationalen Einheiten (U/ml Serum/Std.) angegeben werden, ist die Verdünnung der für die einzelnen Substrate verwendeten Serumverdünnung zu berücksichtigen. Dasselbe gilt für die Bebrütungszeit.

3. Nach (9, 10, 17) lassen sich die Resultate der in pentanolischer Lösung gemessenen Farbstoffe wie folgt umrechnen: $\text{Ext.} \cdot 40 = \mu\text{Äq}$ insgesamt (5 mm Schichtdicke). Die pentanolischen Extrakte müssen im Substratoptimum gemessen und vorher mit Pentanol im Verhältnis 1:10 verdünnt werden.

Unter Zugrundelegung dieser Daten erhält man die *Berechnungsfaktoren* der Tabelle 3.

Tab. 3
Berechnungsfaktoren für die einzelnen Substrate

Substrat	Berechnungsfaktor F
Acetylcholin	1040
Benzoylcholin	1040
α -Naphthylpropionat	800
β -Naphthylpropionat	800
Phenylacetat	8320
Acetylcholin (Ery)	2080
Monosuccinylcholin	4,34
Disuccinylcholin	4,34

Die in Tabelle 3 zusammengestellten Berechnungsfaktoren sind wie folgt zu gebrauchen:

$$R \text{ (Extinktionseinheiten)} \times F = U/\text{ml Serum/Std.}$$

Tab. 4

Beleganalysen von 250 Normalpersonen, eines Falles mit verlängerter Apnoe nach Disuccinylcholin (Serum H) und eines Falles von Myotonie (Serum B)

Substrat	Serum H (24 Stdn. nach Entnahme)	Serum B (24 Stdn. nach Entnahme)	Mittel aus 25 Normal- personen
Acetylcholin	< 1	89,5	92 \pm 20
Benzoylcholin	41,6	76,1	94 \pm 20
α -Naphthylpropionat	63,5	87,2	183 \pm 28
β -Naphthylpropionat	120	309	105 \pm 23
Phenylacetat	580	908	1000 \pm 230
Monosuccinylcholin	0	0	< 1
Disuccinylcholin	0	0	< 1
Acetylcholin (Ery)	55,5	329	173 \pm 32

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, kann man mit den nach dieser Methode erhaltenen Resultaten durch einfache Division — zum Beispiel der Werte Benzoylcholin durch Acetylcholin — eine Zuordnung des Patienten nach dem System von RUBINSTEIN und DIETZ (11) vornehmen, wonach Patienten mit atypischen Esterasen sofort erkannt und von der Behandlung mit Succinylcholin ausgeschlossen werden können. Es zeigt sich weiter, daß außer den bisher in der Literatur hauptsächlich bearbeiteten Substraten Acetylcholin und Benzoylcholin auch noch zusätzlich die Substrate β -Naphthylpropionat, α -Naphthylpropionat, Phenylacetat, sowie die Acetylcholinesterase der Erythrozyten stark verändert sein können (vgl. die in Tabelle 4 kursiv gesetzten Werte). Es bleibt abzuwarten, ob sich bei anderen Fällen von verlängerter Apnoe nach Succinylcholin, von Myotonie, von Myasthenie und ähnlichen Krankheitsbildern, die bisher erhobenen Befunde bestätigen lassen und ob neue charakteristische Befunde an den verschiedenen Serumesterasen hinzukommen. Eine Methode zur einfachen Auffindung solcher Anomalien steht nunmehr zur Verfügung.

Wir danken den Damen Ilse JOHANN, Ingeburg STOLLE und Edith STELZL für ihre Mithilfe bei den experimentellen Arbeiten.

Literatur

1. PILZ, W. und H. HÖRLEIN, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 339, 157 (1964). — 2. BAITSCH, H., Vortrag, gehalten bei der 70. Tagung der Dtsch. Ges. inn. Med., Wiesbaden, April 1964, zit. in Dtsch. med. Wschr. 89, 1229 (1964). — 3. LEHMANN, H. und E. RYAN, Lancet 1956, S. 124. — 4. LISKE, R., C. DEL MORAL und A. LORIA, Nature (London) 1964, S. 815. — 5. KALOW, W. und R. O. DAVIES, Biochem. Pharmacol. 1, 183 (1958). — 6. HARRIS, H. und MARY WHITTAKER, Nature (London) 1961, S. 496. — 7. KALOW, W., Anesthesiology 20, 805 (1959). — 8. GOEDDE, H. W. und W. FUSS, Klin. Wschr. 42, 286 (1964). — 9. PILZ, W., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 1 (1962). — 9a. PILZ, W., Mikrochim. Acta (Wien) 1961, S. 614. — 10. PILZ, W., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 247 (1962). —

11. RUBINSTEIN, H. M. und A. A. DIETZ, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 61, 979 (1963). — 12. PILZ, W., Zschr. exper. Med. 132, 310 (1959). — PILZ, W., Klin. Wschr. 36, 1017 (1958). — PILZ, W., in: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 765, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1963). — 13. PILZ, W., Z. analyt. Chem. 162, 81 (1958). — 14. PILZ, W., Z. analyt. Chem. 166, 189 (1959). — 15. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, I. U. B. Sympos. Series 20, S. 8, Pergamon Press, Oxford (1961); vgl. KING, E. J. und D. M. CAMPBELL, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 6, 301 (1961). — 16. PILZ, W., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck. — 17. PILZ, W. und I. JOHANN, Z. analyt. Chem., 270, 113 (1965).

Dr. Wolfgang Pilz, Leiter des physiol.-chem. u. analyt. Labors der ärztl. Abt. der Farbenfabriken Bayer A.G., 509 Leverkusen — Bayerwerk